

⑯ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND

⑯ Offenlegungsschrift
⑯ DE 3824110 A1



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑯ Aktenzeichen: P 38 24 110.2
⑯ Anmeldetag: 15. 7. 88
⑯ Offenlegungstag: 18. 1. 90

⑯ Int. Cl. 5:
C 07 F 9/141
C 07 F 9/09
C 07 F 9/46
C 07 H 21/04
C 07 K 17/00

(1)

⑯ Anmelder:

Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der
Wissenschaften eV, 3400 Göttingen, DE

⑯ Vertreter:

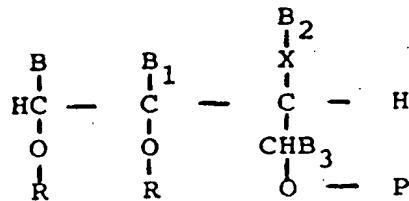
Weickmann, H., Dipl.-Ing.; Fincke, K., Dipl.-Phys.
Dr.; Weickmann, F., Dipl.-Ing.; Huber, B.,
Dipl.-Chem.; Liska, H., Dipl.-Ing. Dr.-Ing.; Prechtel,
J., Dipl.-Phys. Dr.rer.nat., Pat.-Anwälte, 8000
München

⑯ Erfinder:

Wippler, Jürgen, Dipl.-Chem., 8027 Neuried, DE;
Fritz, Hans Joachim, Dr., 8033 Planegg, DE; Cramer,
Matthias, Dipl.-Chem., 5030 Hürth, DE

⑯ Verfahren zur Herstellung und Reinigung von an ihrem 5'-Ende phosphorylierten Oligo- und jPolynukleotidsequenzen und Reagenz zur Durchführung des Verfahrens

Als Phosphorylierungsreagenz, insbesondere zur Phosphorylierung des 5'-Hydroxyendes von Oligo- und Polynukleotiden, eignen sich Verbindungen der allgemeinen Formell



wobei
P eine mit einer OH-Gruppe reaktive Phosphat- oder Phosphitgruppe und
R eine abspaltbare OH-Schutzgruppe darstellt,
X = H, OH, Halogen, Alkyl oder Alkoxy ist oder eine O-, N-, Alkylen- oder Oxyalkylenoxy-Brücke zu B, B₁ oder B₃ darstellt,
einer der Substituenten B bis B₃ eine hydrophobe Verankungsgruppe oder ein an einen Antikörper bindendes Hapten darstellt, die anderen Substituenten B bis B₃ H oder niedrig Alkyl, B₂ auch eine Einfachbindung, bedeuten.

DE 3824110 A1

DE 3824110 A1

Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Phosphorylierungsreagenz, ein Verfahren zu seiner Herstellung sowie ein Verfahren zur Herstellung und Reinigung von an ihrem 5'-Ende phosphorylierten Oligo- und Polynukleotidsequenzen unter Verwendung des Phosphorylierungsreagenzes.

Oligo- und Polynukleotide finden als Träger von Erbinformation in der Gentechnologie eine weite Verwendung. Ihre chemische Synthese erlangt daher mit dem Fortschreiten der Biotechnologie immer mehr an Bedeutung. So sind bisher schon die Gene für pharmakologisch wirksame Substanzen wie Insulin, Interferron oder Somatostatin hergestellt worden.

Die Synthese von Polynukleotiden erfolgt entweder auf enzymatischem oder chemischem Wege. Bei der chemischen Synthese wird im allgemeinen so vorgegangen, daß man die 3'- bzw. 5'-Hydroxygruppen und gegebenenfalls weitere Hydroxy- oder Aminogruppen der Nukleoside in üblicher Weise schützt und mittels reaktiven Phosphorverbindungen zwei Nukleoside durch eine 3',5'-Internukleotidphosphodiesterbindung verknüpft. Im allgemeinen wird die gezielte Synthese von Biopolymersequenzen wie z.B. Polynukleotiden an Festphasen bevorzugt. Dabei wird an einer festen Phase ein erstes Nukleosid bzw. Nukleotid gebunden und anschließend mittels bekannten chemischen oder enzymatischen Verfahren durch stufenweises Aneinanderknüpfen der jeweiligen Nukleotide das gewünschte Polynukleotid aufgebaut. Eine solche Festphasensynthese zeigt eine Reihe von Vorteilen gegenüber einer Synthese in Lösung, da die wachsende Polynukleotidkette auf einfache Weise von anderen Komponenten des Reaktionsgemisches abgetrennt werden kann. So ist es z.B. möglich, chromatographische Trennmethoden durch einfache Wasch- und Filtrationsverfahren zu ersetzen und die Reaktionen beliebig oft zu wiederholen, um auf diese Weise die Ausbeuten zu erhöhen. Auch die Löslichkeit der einzelnen Polynukleotidderivate ist bei dieser Vorgehensweise nicht mehr von Bedeutung, da die einzelnen Reaktionen in heterogener Phase ablaufen. Aufgrund der einfachen Wasch- und Filtrationsmethoden an einer Festphase wird es möglich, die Polynukleotidsynthese automatisch durchzuführen.

Als besonders geeignet für die Synthese an festen Phasen hat sich die phosphoramiditmethode von Matteucci, M.D. und Caruthers, M.H. J. Am. Chem. Soc. (1981) 103, 3185 – 3191 erwiesen.

Es hat sich jedoch gezeigt, daß alle üblichen Syntheseverfahren den Nachteil haben, daß sie nach dem Entschützen Polynukleotide mit einem freien 5'-Hydroxyende ergeben. Solche nicht phosphorylierten Polynukleotide sind jedoch für biologische Prozesse normalerweise nicht brauchbar, weil in der Regel dafür Nukleotidketten benötigt werden, die an ihrem 5'-Ende einen Monophosphatrest aufweisen.

Obwohl es wünschenswert ist, bei der Synthese auch die 5'-Endphosphorylierung auf chemischem Wege durchzuführen, um auch diesen Syntheseschritt automatisch durchführen zu können, werden aufgrund mangelnder Praktikabilität der bekannten chemischen Reagenzien weiterhin enzymatische Phosphorylierungsmethoden bevorzugt. Solche enzymatischen Phosphorylierungen mit z.B. Polynukleotidkinase und ATP weisen jedoch den Nachteil auf, daß aufgrund von inaktivem Enzym, ungenau eingestelltem Puffer oder dem Auftreten von inhibierenden Stoffen die Kinasereaktion nicht oder nur unvollständig abläuft.

Längere Polynukleotide sind ab einer Größe von etwa 40 Basen aufwärts in der Polyacrylamidgelelektrophorese analytisch schlecht von sequenzgleichen, nicht 5'-phosphorylierten zu unterscheiden, so daß es schwierig ist, die Reinheit des Produktes zu überprüfen. Eine hohe Reinheit an 5'-phosphoryliertem Material ist jedoch z.B. bei der Klonierung von Genen unbedingt erforderlich, da auch die nichtphosphorylierten Polynukleotide mit dem entsprechenden Gegenstück der DNA beim Klonieren hybridisieren, ohne jedoch ligiert zu werden. Die Anwesenheit solcher 5'-Hydroxypolynukleotide führt somit zu geringen Ausbeuten an kloniertem Material.

Dies hat zu einer Reihe von Versuchen geführt, die Endphosphorylierung von Oligonukleotiden auf rein chemischem Wege durchzuführen.

E. Ullmann und J. Engels, Tetrahedron Letters, (1986) 27, 1023 – 1026 beschreiben ein Verfahren zur Phosphorylierung des 5'-Endes eines Oligonukleotides durch chemische Umsetzung mit einem monovalenten Phosphorylierungsmittel. Dabei wird das Nukleotid mit einem Phosphorylierungsmittel auf Phosphoramiditbasis umgesetzt und mittels Standardverfahren zum Phosphat oxidiert. Wird dabei ein Phosphorylierungssagens verwendet, das eine Nitrophenylethylgruppe enthält, dann kann der damit erhaltene 5'-Phosphodiester an einer Reversed Phase HPLC vom nicht umgesetzten Material abgetrennt werden. Dieses Verfahren hat jedoch den Nachteil, daß eine schonende Entschüttung und gleichzeitige Reinigung an einer festen Phase nicht möglich ist. Außerdem besitzt die Nitrophenylethylgruppe nur eine geringe Hydrophobizität, so daß entsprechende Oligonukleotide mit Basenlängen größer als 15 schlecht mittels Reversed Phase HPLC zu reinigen sind.

EP-A 8 51 10 454 beschreibt die Abtrennung und Reinigung von durch Tritylierung an ihrem 5'-Ende lipophil geschützten Oligonukleotiden von nicht umgesetztem Material mittels hydrophober Wechselwirkung an einer Reversed Phase Matrix. Auf diese Weise werden jedoch keine 5'-Phosphatoligonukleotide erhalten.

T. Horn und M.S. Urdea, DNA (1986) 5, 421 – 426 beschreiben eine chemische Phosphorylierung des 5'-Endes nach der Phosphoramiditmethode, die zur Anwendung bei der automatischen Oligonukleotidsynthese geeignet ist. Dabei wird ein an eine feste Phase gebundenes Oligonukleotid mit Bis-(β -cyanoethoxy)-N,N-diisopropylaminophosphin umgesetzt. Dieses Verfahren weist jedoch den Nachteil auf, daß die Schutzgruppen schon beim Lösen der Oligonukleotidkette von der Festphase abgespalten werden. Damit besteht keine Möglichkeit, die Phosphatschutzgruppe zur Reinigung auszunutzen. Aus diesem Grunde müssen die Schutzgruppen von dem fertigen phosphorylierten Oligonukleotidprodukt mittels zeitaufwendigen und verlustreichen chromatographischen Verfahren abgetrennt werden.

G.R. Gough et al., Proceedings of the International Symposium on Chemical Synthesis of Nucleic Acids, Egestorf, Deutschland 1980, (ISBN 0 904147 26 6) Seite 99 bis 102 beschreiben ein Verfahren zum Einführen von 3'- bzw. 5'-Phosphatabkömmlingen in Oligodesoxyribonukleotiden. Dabei wird in einem Lösungsmittel ein an seinem 3'-Ende mit einem Ribonukleotid versehenes geschütztes Trinukleotid mit einem 2',3'-tritylierten Uridin

durch eine 5'-5'-Phosphodiesterbindung zu einem Tetranukleotid verknüpft, 5 es anschließend mittels einer ersten Perjodatoxidation, der eine Detritylierung mit anschließender enzymatischer Behandlung durch eine Phosphatase folgt und mittels einer zweiten Perjodatoxidation zum 5'-phosphorylierten Dinukleotid umgesetzt wird. Dieses Verfahren zeigt jedoch eine für die Synthese von Polynukleotiden viel zu geringe Ausbeute und ist zudem nicht an einer festen Phase durchführbar. Um reine Oligonukleotide zu erhalten sind deshalb zeitaufwendige und an Substanz verlustreiche Chromatographieverfahren notwendig. Die Herstellung von Polynukleotiden ist bei den angegebenen Ausbeuten von maximal 70% für einen einzigen Verfahrensschritt nicht möglich.

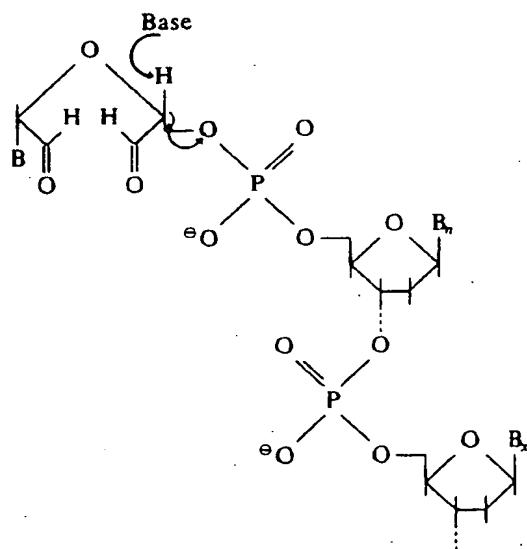
Der Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde, die zuvor geschilderten Nachteile zu überwinden und ein chemisches Verfahren zur Herstellung von an ihrem 5'-Ende phosphorylierten Oligo- und Polynukleotidsequenzen bereitzustellen, das an einer festen Phase durchgeführt werden kann und durch das auf einfache Weise und mit hoher Ausbeute insbesondere auf automatischem Wege die jeweils gewünschten Polynukleotidsequenzen erhalten werden. 10

Diese Aufgabe wird durch das in den Ansprüchen definierte Verfahren gelöst.

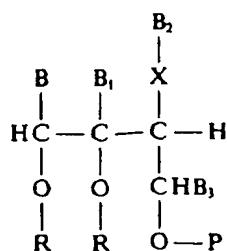
Erfundungsgemäß werden die Polynukleotide in der jeweils gewünschten Sequenz nach an sich bekannten Verfahren gewonnen. Dabei wird im allgemeinen so vorgegangen, daß man die 3'- und 5'-Hydroxygruppen und gegebenenfalls noch weitere Amino- oder Hydroxygruppen der Nukleoside in üblicher Weise schützt und mittels reaktiven Phosphorverbindungen zwei Nukleoside durch eine 3'-5'-Internukleotidphosphodiesterbindung verknüpft. Solche Verfahren sind dem Fachmann bekannt und sind z.B. zusammenfassend in E.L. Winnacker, Gene und Klone VHC 1985, Seiten 44 bis 61, die hiermit ausdrücklich zum Teil der Beschreibung gemacht wird, beschrieben. 15

Im erfundungsgemäßen Verfahren finden sowohl Polydesoxyribonukleotide als auch Polyribonukleotide Verwendung, jedoch müssen bei letzterem die 2'- und 3'-Hydroxygruppen in geschützter Form vorliegen. 20

Die so auf herkömmliche Art gewonnenen 5'-Hydroxypolynukleotide werden erfundungsgemäß an ihrem ungeschützten 5'-Ende mit einem Phosphorylierungsreagenz umgesetzt, welches in gamma- und delta-Stellung zum Phosphorester einen gegebenenfalls geschützten Diol und in beta-Stellung eine positive Austrittsgruppe, vorzugsweise ein H-Atom aufweist und das einen an einer Reversed Phase Matrix haftenden hydrophoben Rest enthält oder ein an einen Antikörper bindendes Hapten aufweist. Anschließend werden die zum Phosphor gamma- und deltaständigen Hydroxyde zu Aldehyden oxidiert und die kationische Austrittsgruppe, die vorzugsweise ein Proton darstellt und mittels einer Base abstrahiert wird, abgespalten. Durch diese β -Eliminierung wird die Phosphodiesterbindung gelöst und die 5'-phosphorylierte Polynukleotidkette freigesetzt. 25



Vorzugsweise wird ein Phosphorylierungsreagenz der allgemeinen Formel I 30



verwendet, wobei 35

P eine mit einer OH-Gruppe reaktive Phosphat- oder Phosphitgruppe und R eine abspaltbare OH-Schutzgruppe darstellt,

X = E, OH, Halogen, Alkyl oder Alkoxy ist oder eine O-, N-, Alkylen- oder Oxyalkylenoxy-Brücke zu B, B₁ oder B₃ darstellt,

5 einer der Substituenten B bis B₃ eine hydrophobe Verankerungsgruppe oder ein an einen Antikörper bindendes Hapten darstellt, die anderen Substituenten B bis B₃ H oder niedrig Alkyl, B₂ auch eine Einfachbindung, bedeuten.

Stellt X eine Brücke zu B, B₁ oder B₃ dar, so ist es ein Sauerstoffatom, welches über eine Etherbindung die Brücke herstellt, ein N-Atom oder eine Alkylen- oder Oxyalkylenoxygruppe und vorzugsweise eine Methylengruppe. Ist P eine Phosphitgruppe, so wird diese vorzugsweise mit Jod zum Phosphat oxidiert.

10 Besonders bevorzugt sind solche Reagenzien, bei denen die beiden benachbarten Hydroxylgruppen des Diols in cis-Stellung zueinander stehen.

In der obigen Formel sind unter einer hydrophoben Verankerungsgruppe solche Gruppen zu verstehen, die an einer Reversed Phase Matrix haften. Im erfindungsgemäßen Verfahren werden dafür zweckmäßigerweise

15 Alkylgruppen mit 6 bis 20, insbesondere mit 8 bis 18 C-Atomen, eine Arylgruppe, eine substituierte Aryl- oder heterocyclische Arylgruppe oder substituierte Alkylgruppe verwendet. Vorzugsweise stellt B eine Naphthyl-, eine Mono-, Di- oder Trinitrobenzyl- oder eine Dinitrobenzyloxyethylgruppe dar.

20 Zweckmäßigerweise werden im erfindungsgemäßen Verfahren solche Reagenzien verwendet, bei denen X eine Brücke zu B derart ausbildet, daß ein Ring entsteht, der die beiden benachbarten Hydroxyle enthält. Vorzugsweise ist dabei X ein Sauerstoffatom und als Ringsystem wird zweckmäßigerweise ein Zucker verwendet.

25 Erfindungsgemäß besonders bevorzugte Reste sind N³-substituierte Uracile, im besonderen N³-(3,5-Dinitrobenzyloxyethyl)-2',3'-o-dibenzoyluracil und N³-Octyl-2',3'-dibenzoyluracil. Es hat sich gezeigt, daß sich das erfindungsgemäße Verfahren besonders gut mit N³-Octyl-2',3'-o-dibenzoyluridin-5'-o-(2-cyanoethyl)disopropylamido-phosphit oder mit N³-(3,5-dinitrobenzyloxyethyl)-2',3'-o-dibenzoyluridin-5'-o-(2-cyanoethyl)-disopropylamidophosphit als phosphorylierungsreagenz durchführen läßt.

30 Erfindungsgemäß ist es jedoch auch möglich solche Reagenzien zu verwenden, bei denen B ein Hapten darstellt. Dabei werden zuerst in an sich bekannter Weise Antikörper, vorzugsweise monoklonale Antikörper, die gegen das gewünschte Hapten gerichtet sind, erzeugt und isoliert und mittels üblichen Verfahren an einer Matrix immobilisiert. Bevorzugt wird als Hapten eine Dinitrophenylbenzyloxyethylgruppe oder Dinitrophenyl- ϵ -aminohexansäure.

35 Das Phosphorylierungsreagenz der allgemeinen Formel I wird durch dem Fachmann bekannte Kupplungsreaktionen an das 5'-Ende der Nukleotidkette angesynthetisiert. Dabei wird das freie 5'-Hydroxyende der Kette mit der Phosphat- bzw. Phosphitgruppe umgesetzt. Zweckmäßigerweise wird hierbei nach dem gleichen Verfahren vorgegangen, das auch zur Synthese der Polynukleotidkette angewendet wird, wobei man vorzugsweise nach dem sogenannten Phosphoramiditverfahren vorgeht. In diesem Fall wird erfundungsgemäß ein Reagenz der allgemeinen Formel I verwendet, bei dem der Rest P ein Amidophosphitrest ist. Dabei wird das Reagenz üblicherweise in Gegenwart von Tetrazol mit dem Polynukleotid umgesetzt.

40 Das Abspalten der Schutzgruppen wird mittels üblichen bekannten Verfahren durchgeführt. Wird das erfundungsgemäß bevorzugte Reagenz mit Benzoyl geschützten Hydroxylen und mit Cyanoethylphosphitestern verwendet, so ist es möglich, beide Schutzgruppen gleichzeitig abzuspalten. Dafür wird vorzugsweise eine wäßrige Ammoniaklösung verwendet. Das Entschützen kann jedoch auch in zwei getrennten Stufen durchgeführt werden, wobei zuerst die Cyanoethylgruppen in nicht wäßriger Lösung mit einer starken organischen Base abgespalten werden. Als starke Base wird vorzugsweise Diisopropylethylamin und insbesondere 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en und als Lösungsmittel Pyridin verwendet. Anschließend werden die O-Benzoylgruppen und die Schutzgruppen der Nukleobasen mit konzentrierter wäßriger Ammoniaklösung abgespalten. Dieses zweistufige Verfahren hat zum Vorteil, daß dabei keine Aminolyse der Phosphotriestergruppe auftreten kann.

45 Nach dem Entschützen wird die phosphorylierte Polynukleotidkette an eine Matrix gebunden und von den Reagenzien und vom nicht umgesetzten Material abgetrennt. Als Matrix wird erfundungsgemäß eine Reversed Phase Matrix oder eine Affinitätsmatrix verwendet.

50 Als Reversed Phase Matrix wird vorzugsweise ein käufliches Präparat verwendet, wie es von verschiedenen Firmen, wie z.B. Kieselgel 60 RP-18 der Firma Merck, Darmstadt, vertrieben wird. Üblicherweise handelt es sich dabei um mit längerkettigen Kohlenwasserstoffen beschichtetes Kieselgelmaterial, wobei erfundungsgemäß Materialien Verwendung finden, die mit einer Kohlenwasserstoffkette von C₈ bis C₁₈ beschichtet sind. Je nach Art des aufzutrennenden Materials ist es jedoch möglich, auch andere Reversed Phase Materialien zu verwenden.

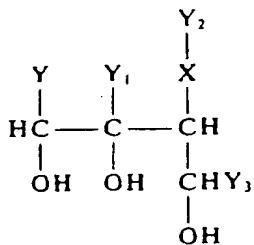
55 Als Affinitätsmatrix wird erfundungsgemäß eine Matrix verwendet, die immobilisierte, vorzugsweise monoklonale, Antikörper enthält, die gegen das Phosphorylierungsagens und zwar im besonderen gegen den Rest B als Hapten gerichtet sind. Die Herstellung und Isolierung von gegen ein bestimmtes Hapten gerichteter Antikörper ist dem Fachmann bekannt. Die Antikörper werden in an sich bekannter Weise auf ein Trägermaterial immobilisiert. Zweckmäßigerweise werden solche Trägermaterialien verwendet, die mit dem Antikörper kuppelnde Gruppen enthalten, wie z.B. reaktive Polystyrole, insbesondere Chlormethylpolystyrol oder Oxirane enthaltende Polyacrylamidkugeln, die unter dem Namen Eupergit C von der Firma Röhm Pharma GmbH, Weiterstadt, erhältlich sind.

60 Obwohl es auch möglich ist, das erfundungsgemäß Verfahren im sogenannten Batch-Verfahren durchzuführen, wird das Matrixmaterial vorzugsweise in eine Säule gefüllt verwendet. Das erfundungsgemäß Verfahren kann sowohl mit einfachen, mit dem Matrixmaterial gefüllten Säulen als auch mit entsprechend gefüllten HPLC-Säulen durchgeführt werden. In einer bevorzugten Ausführungsform werden einfache Kartuschen, wie

z.B. eine RP-C18-Kartusche der Firma Baker, Phillipsburg, New Jersey, USA, verwendet.

Die Oxidation der Diole wird zweckmäßigerweise an den festphasengebundenen Polynukleotiden durchgeführt. Dabei wird das mit Substanz beladene Matrixmaterial mit einer Lösung eines Oxidationsmittels behandelt. Als Oxidationsmittel finden alle Substanzen Verwendung, die Hydroxygruppen schonend zu Aldehyden oxidieren. Vorzugsweise werden jedoch Perjodate und Bleitetraacetate verwendet.

Gegenstand der Erfindung ist weiter ein Verfahren zur Darstellung des Phosphorylierungsreagenzes. Dabei wird ein Diol der allgemeinen Formel II



in der Y bis Y₃ gleich B bis B₃ sind oder eine mit B bis B₃ verknüpfbare Gruppe darstellen und X und B bis B₃ die in Anspruch 1 definierte Bedeutung aufweisen, zuerst mit einem die benachbarten Diolhydroxyle schützenden Reagenz und dann die endständige Hydroxygruppe mit einer Phosphorverbindung der allgemeinen Formel (R₁R₂R₃)P (R₁R₂R₃)PO oder P(R₁—S) umsetzt, wobei die Reste R₁—R₅ gleich oder verschieden sind und gut hydrolysierbare Austrittsgruppen darstellen.

Die Herstellungsweisen solcher Diole der allgemeinen Formel II sind vielfältig und dem Fachmann bestens bekannt. So ist es z.B. möglich, ausgehend von einer β , γ -ungesättigten Fettsäure durch Reduktion der Carbonsäurefunktion mit LiBH₄ einen γ , δ -ungesättigten Alkohol darzustellen, der wiederum durch Umsetzen der Doppelbindung mit HOCl oder vorzugsweise mit OsO₄ oder MnO₄⁻ in den gewünschten Diol überführt wird. Eine weitere Möglichkeit, Verbindungen der Formel II darzustellen besteht in der Umsetzung von Glycerinaldehyd mit Acetaldehyd mittels einer Aldoladdition und anschließender Verknüpfung des Restes B mit der Aldehydfunktion sowie Oxidation der gebildeten Doppelbindung zum Diol.

Bevorzugt wird als Diol der allgemeinen Formel II ein Kohlenhydrat, insbesondere ein Zucker wie ein Penta- oder Hexasaccharid verwendet. Zweckmäßigerweise werden dazu erfindungsgemäß Ribosen, Glucosen, Mannosen, Allosen und andere geeignete Zucker verwendet, die leicht mit einem Rest B auf an sich bekannte Weise verknüpft werden. Besonders bevorzugt werden erfindungsgemäß Ribonukleoside wie z.B. Adenosin, Uridin, Guanosin, Cytidin, Inosin und Thymidin oder andere mit Ribose verknüpfte Naturstoffe wie z.B. Riboflavin als Diol der allgemeinen Formel II verwendet.

Solche leicht zugänglichen Diole werden gegebenenfalls nach dem Schützen weiterer reaktiver Gruppen mit einem Hapten oder einer hydrophoben Verankerungsgruppe wie z.B. einer langkettigen Fettsäure, einem Alkohol oder einem aromatischen Ringsystem wie Naphthalin bzw. deren substituierten Derivate umgesetzt.

Diese hydrophoben Reste bzw. das Hapten wird, sofern es nicht schon von vorneherein im Diolmolekül vorhanden ist, wie z.B. bei langkettigen Alkoholen, mittels dem Fachmann bekannten Verfahren mit dem Diolrest verknüpft. Hierfür haben sich insbesonders Reaktionen mit einer Aldehydgruppe oder auch einfache nukleophile Substitutionen z.B. mittels Jod oder Paratolulsulfonat als Austrittsgruppen bewährt.

Als Schutzgruppen für die benachbarten Diole sind insbesondere Benzoësäure oder Aceton geeignet, die zu den entsprechenden Benzoësäureestern bzw. zur Isopropylidenverbindung unter Wasserabspaltung umgesetzt werden, und als Schutzgruppe für die endständige üblicherweise 5'-Hydroxygruppe wird vorzugsweise ein Dimethoxytritylchlorid oder ein Anisoylderivat verwendet.

Als Phosphorverbindungen, die erfindungsgemäß mit dem freien Hydroxylende des Diols umgesetzt wird, haben sich sowohl drei- als auch fünfwertige Verbindungen des Phosphors als geeignet erwiesen. Vorzugsweise werden im erfindungsgemäßen Verfahren jedoch dreiwertige Phosphorverbindungen wie Phosphoramidite verwendet, die nach Verknüpfung mit dem freien Hydroxylende des Diols der allgemeinen Formel II mittels Jod zum fünfwertigen Phosphat oxidiert werden. Insbesondere wird diese Oxidation nach dem Umsetzen des erfindungsgemäßen Phosphorylierungsreagenzes der allgemeinen Formel I mit dem Polynukleotid durchgeführt.

Mit Hilfe des erfindungsgemäßen Verfahrens ist es möglich, an ihrem 5'-Ende phosphorylierte Polynukleotide auf einfache Weise und mit hoher Ausbeute herzustellen, ohne daß das Produkt die in biologischen Experimenten störenden, nicht phosphorylierten Polynukleotide enthält.

Auf diese Weise können Polynukleotide mit Längen von über 50 Monomeren hergestellt werden, die auch in einer Polyacrylamid Gelelektrophorese ein reines Produkt zeigen. Werden die erfindungsgemäß bevorzugten Phosphoramiditerivate als Phosphorylierungsreagenz der allgemeinen Formel I verwendet, so ist es möglich, das erfindungsgemäße Verfahren in der gebräuchlichen DNA-Synthesestrategie anzuwenden. Die erfindungsgemäßen Phosphorylierungsreagenzen sind leicht zugänglich und die Reinigung und Abspaltung der jeweiligen Reagenzen werden mit einfachen käuflichen Substanzen durchgeführt. Durch das Anlagern der Polynukleotide an eine feste Phase ist das zeitraubende und verlustreiche Abtrennen der Reagenzen mittels chromatographischen Methoden unnötig geworden, da diese einfach mit einem Lösungsmittel abgespült werden. Die Gewinnung des gereinigten 5'-phosphorylierten Polynukleotids wird mit üblichen Reversed-Phase-HPLC-Puffern durchgeführt. Diese sind dampfflüssig und entweichen daher bei der Gefriertrocknung. Auf diese Weise wird

ein Polynukleotid erhalten, das sich völlig gleich verhält wie ein herkömmlich durch eine enzymatische Kinasereaktion gewonnenes 5'-phosphoryliertes Polynukleotid. Da sämtliche Verfahrensmaßnahmen an fester Phase und durch Zupipettieren der gelösten Reagenzien durchgeführt werden ist es möglich, das erfindungsgemäße Verfahren zu automatisieren. Dadurch kann die Reinigung und anschließende Klonierung dieser Oligonukleotide an einem einzigen Tag durchgeführt werden.

5

Beispiel 1

Synthese der Dinitrobenzyloxyethyl-Monomere

10

1. 3,5-Dinitrobenzyloxyethanol

15

In 100 ml Tetrahydrofuran werden zuerst 70 ml Glykol und dann 0,67 g Natrium (28,0 mMol) gelöst und nach Abkühlen auf 0°C 5,0 g 3,5-Dinitrobenzylchlorid (26,0 mMol, gelöst in 40 ml Tetrahydrofuran) innerhalb 2 Stunden unter Rühren bei 0°C zugetropft. Man lässt die Lösung sich auf Raumtemperatur erwärmen und röhrt, bis die Reaktion vollständig abgelaufen ist. Das Reaktionsende wird mittels einem Dünnschichtchromatogramm bestimmt, Eluens: Essigsäureethylester; $rF = 0,58$. Anschließend wird der gesamte Ansatz mit 700 ml gesättigter NaHCO_3 -Lösung ausgeschüttelt. Die organische Phase schüttelt man zweimal mit je 100 ml Dichlormethan und wäscht anschließend zweimal mit je 300 ml Wasser. Nach dem Trocknen der Dichlormethan-Phase wird das Lösungsmittel unter Vakuum abgedampft und der Rückstand aus Toluol kristallisiert. Die Ausbeute beträgt 4,2 g (66,7%). Im $^1\text{H-NMR}$ sind die ^1H -Resonanzen qualitativ und quantitativ dem Produktmolekül zuortbar. Das Massenspektrum zeigt einen Massenpeak beim Verhältnis m/e 242 (berechnete relative Molekularmasse ($\text{C}_9\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_6$):242).

20

25

2. p-Toluolsulfonsäure-(3,5-dinitrobenzyloxy)-ethylester

30

35

40

45

50

55

4,0 g 3,5-Dinitrobenzyloxyethanol (16,3 mMol) und 6,0 g p-Toluolsulfonsäurechlorid (28,0 mMol) werden in 80 ml Pyridin gelöst und bei Raumtemperatur gerührt. Das Reaktionsende ist nach ca. 3 Stunden erreicht. Das Reaktionsende wird mittels einem Dünnschichtchromatogramm bestimmt. (Eluens: Essigsäureethylester, n-Hexan 7 : 3; $rF = 0,82$). Nach Abdampfen des Pyridins unter Vakuum wird der Rückstand mit 700 ml 5%iger Na_2CO_3 -Lösung ausgeschüttelt. Die organische Phase schüttelt man zuerst zweimal mit je 100 ml Dichlormethan aus und wäscht anschließend zweimal mit je 300 ml Wasser. Nach dem Trocknen der Dichlormethan-Phase über Na_2SO_4 wird das Lösungsmittel unter Vakuum abgedampft und der Rückstand aus Toluol kristallisiert. Die Ausbeute beträgt 5,9 g (91,4%). Im $^1\text{H-NMR}$ sind die ^1H -Resonanzen qualitativ und quantitativ dem Produktmolekül zuortbar. Elementaranalyse, berechnet (%) / gefunden (%), ($\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_8\text{S}_1$): C, 48,48 / 49,47; H, 4,07 / 4,14; N, 7,07 / 7,30. Das MS zeigt einen Massenpeak beim Verhältnis m/e 396 (berechnete relative Molekularmasse: 396).

3. 5'-O-4,4'-Dimethoxytrityl-2',3'-O-dibenzoyluridin

40

45

50

55

Zu einer Lösung von 6,0 g Uridin (24,6 mMol) in 90 ml Pyridin werden bei 0°C 9,15 g 4,4'-Dimethoxytritylchlorid (27,1 mMol) gegeben. Nach einer Stunde Reaktion bei 0°C und weiteren drei Stunden bei Raumtemperatur, wobei die Reaktion durch Dünnschichtchromatographie kontrolliert wird (Eluens: Dichlormethan, Ethanol, Pyridin 94,5 : 5 : 0,5, $rF = 0,23$) werden 6,6 ml Benzoylchlorid zugegeben und weitere 30 Minuten gerührt ($rF = 0,70$). Hiernach hydrolysiert man mit 20 ml H_2O für 15 Minuten und dampft im Vakuum ein. Der Rückstand wird mit 600 ml 5%iger Na_2CO_3 -Lösung ausgeschüttelt und dreimal mit 70 ml Dichlormethan extrahiert. Nach Trocknen der Dichlormethanphase über Na_2SO_4 dampft man das Lösungsmittel ab. Durch mehrmaliges Auflösen und Abdampfen des Rückstandes mit Toluol wird das rohe Produkt pyridinfrei gemacht. Die Reinigung erfolgt mittels einer Kieselgel-Säulenchromatographie (Säule 5 cm Querschnitt, 160 g Si_6OH , Eluens: Essigsäureethylester/Hexan/Pyridin 49,75 / 49,75 / 0,5). Reine Fraktionen werden nach Eindampfen und Aufnehmen in 10 ml Toluol aus Essigester, n-Pentan (50 ml : 950 ml) präzipitiert. Ausbeute: 12,7 g (68,4%); $^1\text{H-NMR}$: die ^1H -Resonanzen sind qualitativ und quantitativ dem Produktmolekül zuortbar. Elementaranalyse, berechnet (%) / gefunden (%), ($\text{C}_{44}\text{H}_{38}\text{N}_{20}\text{O}_{10}$): C, 70,01 / 70,05; H, 5,07 / 5,07; N, 3,71 / 3,53. Das FAB-MS (Xe) zeigt einen Massenpeak beim Verhältnis m/e 754 (berechnete relative Molekularmasse: 754).

55

4. N^3 -(3,5-Dinitrobenzyloxyethyl)-3',2'-O-dibenzoyluridin

60

65

65

8,3 g 5'-O-4,4'-Dimethoxytrityl-2',3'-O-dibenzoyluridin (10,9 mMol) und 4,8 g p-Toluolsulfonsäure(3,5-dinitrobenzyloxy)-ethylester (12,2 mMol) werden in 70 ml trockenem Dimethylsulfoxid gelöst. Nach Zugabe von 4,0 g trockenem kristallinen K_2CO_3 wird ca. 20 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und die Reaktion mittels Dünnschichtchromatographie kontrolliert; (Eluens: Essigsäureethylester, n-Hexan 7 : 3; $rF = 0,56$). Der Reaktionsansatz wird in 800 ml konzentrierte NaHCO_3 -Lösung ausgeschüttelt. Die organische Phase schüttelt man zweimal mit je 100 ml Dichlormethan und wäscht anschließend zweimal mit je 300 ml Wasser. Nach Trocknen der Dichlormethan-Phase wird das Lösungsmittel unter Vakuum abgedampft und der Rückstand mit zweimal 100 ml Toluol unter Vakuum coevaporiert. Hiernach werden zum Rückstand 250 ml 3%ige Trichloressigsäure (in Dichlormethan, W/V) gegeben und zwei Minuten bei Raumtemperatur gerührt ($rF = 0,22$). Die Reaktion wird durch Zugabe von 30 ml Pyridin gestoppt. Den Reaktionsansatz schüttelt man zweimal mit je 400 ml Wasser aus und engt unter Vakuum zum Öl ein. Der Rückstand wird in 15 ml Toluol aufgenommen und aus Essigsäureethy-

ester, n-Hexan (50 ml) präzipitiert. Das Präzipitat wird aus Methanol-Toluol (9 : 1) umkristallisiert. Die Ausbeute beträgt 5,6 g (73,9%). Im ¹H-NMR sind die ¹H-Resonanzen qualitativ und quantitativ dem Produktmolekül zuordnbar. Elementaranalyse, berechnet (%)/gefunden (%), (C₃₂H₂₈N₄O₁₃): C, 56,80/57,81; H, 4,17/4,32; N, 8,28/8,40. Das MS zeigt einen Massenpeak beim Verhältnis m/e 677 (berechnete relative Molekularmasse: 677).

5 5. N³-(3,5-Dinitrobenzyloxyethyl)-2',3'-O-dibenzoyluridin-5'-O-(2-cyanoethyl)-diisopropylamido-phosphit

Alle Arbeiten werden unter Argon ausgeführt. 0,5 g N³-(Dinitrobenzyloxyethyl)-3',2'-O-dibenzoyluridin (0,69 mMol) werden in 10 ml trockenem Toluol gelöst und unter Vakuum eingedampft, um Spuren von Wasser azeotrop zu entfernen. Der Rückstand wird in 25 ml trockenem Tetrahydrofuran gelöst, 0,63 ml Diisopropylethylamin (3,61 mMol) zugegeben und auf 0°C abgekühlt. Durch ein Gummiseptum werden 0,31 ml Diisopropylamino-2-cyanoethoxychlorophosphin (1,62 mMol) mit einer Spritze innerhalb 3 Minuten bei 0°C unter Rühren der Tetrahydrofuranlösung zugegeben. Die Lösung wird noch weitere 30 Minuten bei 0°C und 10 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion verfolgt man mittels Dünnschichtchromatographie (Essigsäureethylester, n-Hexan, Pyridin 59,5 : 40 : 0,5; Edukt rF = 0,69, Produkt rF = 0,80). Der Reaktionsansatz wird mit 250 ml 5%iger wäßriger eiskalter Natriumcarbonatlösung (Argon-gesättigt) ausgeschüttelt und das Gemisch mit 50 ml Dichlormethan (Argon-gesättigt) extrahiert. Die organische Phase trocknet man über Natriumsulfat und engt zum Öl im Vakuum bei Raumtemperatur ein. Die Reinigung erfolgt durch eine Säulenchromatographie: (Säulenquerschnitt 3 cm, 50 g Al₂O₃, neutral, Eluens: Dichlormethan, n-Hexan, Pyridin — 89 : 10 : 1). Reine Fraktionen werden gesammelt und nach dem Einengen am Rotationsverdampfer unter Vakuum zum Öl noch zweimal mit je 100 ml Toluol evapiert. Das Produkt lyophilisiert man über Nacht aus 20 ml Benzol. Die Ausbeute beträgt 0,2 g (33,1%). Das MS zeigt einen Massenpeak beim Verhältnis m/e 877 (berechnete relative Molekularmasse (C₄₁H₄₅N₆O₁₄P₁) : 877).

25 Beispiel 2

Synthese der Oktyl-Monomere

4. N³-Oktyl-2',3'-O-dibenzoyluridin

Die Darstellung erfolgt analog derjenigen des N³-(3,5-Dinitrobenzyloxyethyl)-3',2'-O-dibenzoyluridin, jedoch mit 0,75fachem Ansatz: 5,0 g 5'-O-4,4'-Dimethoxytrityl-2',3'-O-dibenzoyluridin (6,6 mMol), 1,8 g Oktyljodid (7,5 mMol), restliche Chemikalien 3/4 der Menge von Beispiel 1.4. Das Oktyljodid ist nach 3 Stunden bei Raumtemperatur umgesetzt (Reaktionskontrolle durch Dünnschichtchromatographie; Essigsäureethylester, n-Hexan, 1 : 1; Edukt rF = 0,29, Produkt rF = 0,53). Nach der Tritrylie rung und Ausschütteln erfolgt die Reinigung durch eine Säulenchromatographie (Säulenquerschnitt 5 cm, 80 g Silicagel Si60H, Eluens: Petrolether, Essigester 7 : 3). Reine Fraktionen werden gesammelt und nach dem Einengen am Rotationsverdampfer unter Vakuum als Öl bei -20°C gelagert. Die Ausbeute beträgt 2 g (50%). Im ¹H-NMR sind die ¹H-Resonanzen qualitativ und quantitativ dem Produktmolekül zuordnbar. Elementaranalyse: berechnet (%)/gemessen (%), (C₃₁H₃₆N₂₀O₁₈) : C, 65,96/67,29; H, 6,38/6,68; N, 4,96/4,55. Das FAB-MS (Xe⁺) zeigt einen Massenpeak beim Verhältnis m/e 565 (berechnete relative Molekularmasse: 565).

2. N³-Oktyl-2',3'-O-dibenzoyluridin-5'-O-(2-cyanoethyl)-diisopropylamido-phosphit

Alle Arbeiten werden unter reinem Argon durchgeführt. 0,65 g N³-Oktyl-2',3'-O-dibenzoyluridin (1,15 mMol) werden in 10 ml trockenem Toluol gelöst. Spuren von Wasser entfernt man durch azeotropes Destillieren im Vakuum. Der Rückstand wird in 35 ml trockenem Tetrahydrofuran gelöst und 1,0 ml Diisopropylethylamin (5,73 mMol) zugegeben. Durch ein Gummiseptum werden 0,44 ml Diisopropylamino-2-cyanoethoxy-chlorophosphin (2,30 mMol) mit einer Spritze innerhalb 3 Minuten bei Raumtemperatur unter Rühren der Tetrahydrofuranlösung zugegeben. Die Lösung wird noch weitere 15 Minuten gerührt. Die Reaktion verfolgt man mittels Dünnschichtchromatographie (Essigsäureethylester, n-Hexan, Pyridin 59,5 : 40 : 0,5; Edukt rF = 0,68, Produkt rF = 0,90). Der Reaktionsansatz wird mit 250 ml 5%iger wäßriger eiskalter Natriumcarbonatlösung (Argon-gesättigt) ausgeschüttelt und das Gemisch mit 50 ml Dichlormethan (Argon-gesättigt) extrahiert. Die organische Phase trocknet man über Natriumsulfat und engt zum Öl im Vakuum bei Raumtemperatur ein. Verbliebene flüchtige Substanzen werden durch mehrmaliges Abdampfen mit trockenem Toluol entfernt. Der ölige Rückstand wird bei -20°C aufbewahrt. Ausbeute: 0,7 g (80%). FAB-MS (Xe⁺) zeigt einen Massenpeak beim Verhältnis m/e 765 (berechnete relative Molekularmasse (C₄₀H₅₃N₄O₉P₁) : 765).

60 Beispiel 3

Oligodesoxyribonukleotidsynthese mit den modifizierten Uridinen am 5'-Terminus

Die Synthese wird an einem Applied Biosystems DNA-Synthesizer Modell 380 A (Applied Biosystems Inc, Foster City, CA, USA) durchgeführt. Es werden die original Cyclen abbc 11 (für 1 μMol Synthesen) und ssbc102 (für 0,2 μMol Synthesen) verwendet (Applied Biosystems User Bulletin DNA Synthesizer Issue No. 36, Juli 1, 1986 (Revised)). Das N³-Oktyl-2',3'-O-dibenzoyluridin-5'-O-(2-cyanoethyl)-diisopropylamido-phosphit setzt man als Lösung in trockenem Acetonitril (70 mg/ml, analog zu Thymidin) zur automatisierten Synthese ein. Das N-(3,5-Dinitrobenzyloxyethyl)-2',3'-O-dibenzoyluridin-5'-O-(2-cyanoethyl)-diisopropylamido-phosphit löst sich

schlecht in Acetonitril. Hier werden ca. 20 mg/ml in trockenem Acetonitril gelöst. Wegen der langen Standzeiten dieser Lösungen in den Teflonschläuchen des DNA-Synthesizers wird der Kopplungsschritt zweimal durchgeführt (wenn die Kopplung nur einmal pro Oligodesoxynukleotidsynthese durchgeführt wird, können während der langen Standzeiten Sauerstoff und Wasserdampf durch die Teflonschläuche diffundieren, wodurch die Ausbeute sinkt). Die Kopplungsschritte, für 1 μ Mol Synthesen waren wie folgt: 2s Tetrazol zum Abfall, 10s Base und Tetrazol zur Säule (FluBrate: 1,5 ml/min), 120s warten; die Schritte werden wiederholt. 0,2 μ Mol Synthesen wurden folgendermaßen durchgeführt: 2 s Tetrazol zum Abfall, 5 s Base und Tetrazol zur Säule, 10 s warten, 4 s # 18 (Acetonitril) zur Säule, 20 s warten; die Schritte werden wiederholt. Für die Entschützung und Abspaltung der synthetisierten Oligodesoxynukleotide wird ebenfalls ein Standardterminationszyklus benutzt. Jedoch wird dabei anstelle der Thiophenollösung #8, welche die Standard-Reaktion vorsieht, wird eine 5%ige Lösung von 1,8-Diazabicyclo-(5.4.0)-undec-7-en in trockenem Pyridin verwendet. Die Syntheseschritte für 1,0 sowie 0,2 μ Mol Synthesen waren wie folgt: 30 s #8 zur Säule (FluBrate ca. 1,5 ml/min), 600 s warten, 15 s #8 zur Säule, 600 s warten.

15

Beispiel 4

Reinigung von Dinitrobenzyloxyethyl-U-oligodesoxynukleotiden

1. Reinigung und Immobilisierung von Ig 22/20

20

Die Reinigung erfolgt nach Dissertation Rudolf Mieran, 1983, S. 18 – 19, Univ. Köln.

Immobilisierung: Der gereinigte Antikörper Ig 22/20 wird in einen Phosphatpuffer (0,1 M KH₂PO₄ – pH = 8,0) umdialysiert. Auf 1 g Eupergit C, (Kugeln aus Polyacrylamid, mit Oxiranringen als kupplungsfähige Gruppen) werden 10,0 mg Ig 22/20 in 9,0 ml Phosphatpuffer (der 0,1% p-Hydroxybenzoësäureethylester enthält) 48 Stunden bei Raumtemperatur geschüttelt. Durch mehrmaliges Dekantieren und Zugeben wird der beladene Antikörper auf Capp-Puffer eingestellt (10% Ethanolamin, 0,2% Natriumacid auf pH = 9,0 mit HCl eingestellt). Das gecappte Eupergit C wird abgenutscht, erst mit 50 ml Wasser und dann zweimal mit je 50 ml PBS gewaschen (PBS = Phosphate Buffered Saline, 140 mM NaCl, 10 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄). Das Material füllt man in eine Säule. Die Antikörpersäule ist in PBS (mit 0,3% Natriumacid W : V) monatelang bei 4°C lagerbar.

25

30

2. Affinitätschromatographie von Dinitrobenzyloxyethyl-U-oligodesoxynukleotiden

35

Die Antikörpersäule wird mit ca. 12 ml PBS gewaschen. 1/3 bis 1/5 des rohen Syntheseproduktes wird nach dem Entschützen, wie in Beispiel 5 beschrieben, und Lyophilisieren in 1 ml PBS gelöst und auf die Antikörpersäule bei Raumtemperatur aufgetragen. Mit weiteren 8 ml PBS wäscht man diejenigen Oligodesoxyribonukleotide aus, die kein Dinitrobenzyloxyethyl-U enthalten aus. Das Produkt wird mit 3 ml einer 80 mM Lösung von N-(2,4-Dinitrophenyl)-capronsäure in PBS von der Säule eluiert. Die dritte ml-Fraktion enthält das Produkt. Diese Fraktion wird gefriergetrocknet und danach einer Flüssigphasenabspaltung unterworfen, wie in Beispiel 5 unter 2. beschrieben.

40

Beispiel 5

Reinigung von Oktyl-U-oligodesoxyribonukleotiden

45

1. Reinigung mittels Reversed Phase Kartusche:

Dabei entschützt man das Oligonukleotid über Nacht bei 55°C in 25%igem Ammoniak, wie bei üblichen Synthesen. Hiernach wird der entschützte Ansatz mit 80%iger Essigsäure (mit ca. 1/3 an Volumen der NH₃-Lösung) neutralisiert. Zeitlich parallel spannt man eine Kartusche (Firma Baker, RP C₁₈) senkrecht ein und wäscht 10 Minuten mit zweimal 500 μ l 50% MeOH. Dabei läßt man die Lösung langsam durchlaufen und erzeugt gegebenenfalls mit einer Gilsonpipette etwas Gas-Druck. Die Kartusche wird nun dreimal mit 500 μ l 0,1 M Triethylammoniumacetat Puffer (TEAA), pH 7,0 equilibriert und anschließend trägt man je nach Synthese-Qualität und -Menge (0,2 oder 1,0 μ Mol-Synthese) 1/3 bis 1/5 der Gesamtsynthese an neutralisierter Oligonukleotid-Lösung langsam auf die Kartusche auf. Dann wird dreimal mit 300 μ l 15% Acetonitril (in 0,1 M TEAA, pH 7) gewaschen, um die Oktyl-freien Oligonukleotide zu entfernen. Bei Oligonukleotiden größer 20mere benutzt man 12% Acetonitril. Nun wird, wie zuvor, nochmals mit 0,1 M Triethylammoniumacetat-Puffer, pH 7,0 equilibriert.

Zur Oxidation der Cis-Diole am Uridin wäscht man mindestens 15 Minuten lang die Kartusche dreimal mit 300 μ l 50 mM NaIO₄-Lösung. Dabei muß die Zeit gut eingehalten und nur hydrostatischer Druck verwendet werden. Die Kartusche wird durch zweimaliges Waschen mit 300 μ l H₂O von Salzen befreit.

Die oxidierte Ribose wird durch 30minütiges Waschen der Kartusche mit viermal 300 μ l 5%igem wäßrigem Triethylamin einer β -Eliminierung unterzogen. Auch hier muß die Zeit gut eingehalten und nur hydrostatischer Druck angewendet werden. Schließlich wird die Kartusche von Triethylamin durch viermaliges Waschen mit 300 μ l 0,1 M TEAA, pH 7 befreit und das 5'-phosphorylierte Oligonukleotid mit zweimal 200 μ l 15% Acetonitril (in 0,1 M TEAA, pH 7,0) von der Kartusche eluiert. Danach wird mit der gleichen Menge an 30%igem Acetonitril die Elution wiederholt und das Eluat in einem Eppendorf-Gefäß aufgefangen.

Die Lösung lyophilisiert man im Hochvakuum. Nach Aufnahme des Rückstandes in 20 μ l H₂O wird erneut im Hochvakuum lyophilisiert, um Reste von Triethylammoniumacetat zu entfernen. Das fertige 5'-phosphorylierte

Oligonukleotid wird anschließend in einem Lagerpuffer (10 mMolar Tris/HCl, 1 mMolar EDTA, pH 8,0) aufgenommen.

2. Reinigung mittels HPLC:

Die Probe wird, wie zuvor beschrieben, entsalzt. Hiernach wird 1/3 bis 1/5 der neutralisierten Lösung auf einer C₁₈-Reversed-Phase-HPLC chromatographiert, wobei sich das erfundungsgemäß gewonnene Oligonukleotid analog den 5'-Dimethoxytrityloligodesoxynukleotiden verhält. Reine Fraktionen können nach Verdünnen mit Wasser auf 12% Acetonitril mittels einer C₁₈-RP-Kartusche wie zuvor beschrieben, weiter behandelt werden. Bei Oligodesoxynukleotiden die länger als 40 Basen sind, sollte eine Flüssigphasenabspaltung durchgeführt werden. Die gesammelten HPLC-Fraktionen werden vereinigt und im Hochvakuum eingedampft. Für die anschliessende Flüssigphasenabspaltung wird der Rückstand in 50µl 25 mM NaO₄ gelöst und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Hiernach werden 50µl 25 mM Rhamnose zugegeben und ebenfalls 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Zuletzt werden 100µl 5%ige Triethylamin-Lösung zugegeben und 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktionslösung dampft man dann im Hochvakuum ein und entsalzt durch eine DEAE 52-Säulenchromatographie. Dafür werden ca. 50 mg DEAE 52 Ionenaustauscher in 1 ml 2 M Triethylammoniumhydrogencarbonat (pH 7,5 bis 8) auf Eis 30 Minuten lang gequollen und etwa 20 mm³ gequollenes DEAE 52-Material wird in eine kleine Säule gefüllt und mit dreimal 300µl 0,1 M Triethylammoniumhydrogencarbonat (pH 7,5 – 8) gewaschen. Die Oligonukleotid-haltige Lösung wird nach Verdünnen auf 10 mM an Salzen langsam durch die Säule passiert. Die Säule wäscht man danach mit zweimal 200µl 0,1 M Triethylammoniumhydrogencarbonat (pH 7,5 bis 8) und danach wird das Oligonukleotid mit zweimal 200µl 2 M Triethylammoniumhydrogencarbonat (pH 7,5 bis 8) von der Säule eluiert und in einem Eppendorfgefäß aufgefangen. Die Probe lyophilisiert man im Hochvakuum und nimmt die DNA in TE-Lagerpuffer auf. Wenn Salzreste nicht unbedingt stören ist es auch möglich, eine Ethanolfällung durchzuführen. Die Lösung wird nach der Abspaltungs-/Eliminierungsreaktion lyophilisiert, in 40µl Wasser aufgenommen und mit 120µl Ethanol versetzt. Nach 2 Stunden bei 0°C zentrifugiert man 5 Minuten in einer Eppendorfzentrifuge, 1400 rpm. Der Überstand wird abgehoben und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet.

Beispiel 6

Wie in den vorhergehenden Beispielen beschrieben, wurden folgende Dinitrobenzyloxyethyl- (DNB) und Oktyl(OKT) Uridin- (U) Oligonukleotide hergestellt:

1. DNB-U-16C, Okt-U-16C, 16/17mere
DNB/OKT-U-5'-GGT.TTT.CCC.AGT.CAC.G-3'
2. OKT-U-16T, 16/17mer
OKT-U-5'-GGT.TTT.CCT.AGT.CAC.G-3'
3. PIEROTCR, Mutageneseoligonukleotid
Okt-U-5'-CAG.ATC.ATC.TAA.CCT.CA-3'
4. TN5TM, Mutageneseoligonukleotid
Okt-U-5'-GTT.CAA.TCA.TGA.TAT.CCG.ATC.CTC.ATC-3'
5. REIREP81, Mutageneseoligonukleotid
Okt-U-5'-CTA.TCA.GCT.CAC.TGC.AAC.CGG.AAG.ACA.TCG.CGA-3'
6. SALFXA, Mutageneseoligonukleotid
Okt-U-5'-CAT.CCT.TTA.TGG.TCG.CCC.TAC.CCT.CGA.TGT.CGA.CGG.TCG.AAA.TTC.ACC.TC-3'

Die Oligonukleotide wurden gereinigt und einer analytischen Polyacrylamid-Gelelektrophorese unterworfen. Die Ergebnisse sind in Fig. 1 dargestellt. Fig. 1 zeigt die Ergebnisse einer analytischen Polyacrylamid-Gelelektrophorese von rohen und gereinigten Okt/DNB-U-Oligonukleotiden.

1: Okt-U-16C roh; 2: Okt-U-16C Kartuschen-gereinigt; 3: 16C kinasiert und Gel-gereinigt; 4: DNB-U-16C Affinitätsgereinigt; 5: Pierotor roh; 6: Pierotor Kartuschengereinigt; 7: Tn5tm roh; 8: Tn5tm Kartuschen-gereinigt; 9: REIREP81 roh; 10: REIREP81 Kartuschen-gereinigt; 11: REIREP81 RP-HPLC-gereinigt, anschließend auf der Kartusche abgespalten; 12: SALFXA RP-HPLC-gereinigt; 13: SALFXA RP-HPLC-gereinigt mit anschließender Flüssigphasenabspaltung.

Die Zahlen über den Balken geben Länge oder Oligonukleotide nach Abspaltung des Uridin-Restes an. Das Gel enthält 14% Polyacrylamid und die Oligonukleotide wurden mit "Stains All" (Applied Biosystems Inc, User Bulletin) angefärbt. Daraus ist ersichtlich, daß es mit dem erfundungsgemäßen Verfahren möglich ist, phosphorylierte Oligo- und Polynukleotide in reiner Form darzustellen.

Beispiel 7

Die biologische Aktivität der erfundungsgemäß phosphorylierten Nukleotidsequenz Nr. 1 des Beispiels 6 wurde mittels der Markerausbeuten von Mutagenesen im Vergleich mit einem sequenzgleichen kinasierten Oligonukleotid verglichen. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Oligonukleotid	Art der 5'-Phosphorylierung	Y
5 16C	enzymatisch auf herkömmliche Weise mit Kinase phosphoryliert und durch PAGE gereinigt	66
Okt-U-16C	erfindungsgemäß phosphoryliert gereinigt durch RP-HPLC	88

10 10 Mutagenesemethode 3.3.L5 (Nucl.Acids Res. 12, 9441 – 9456 (1984)).

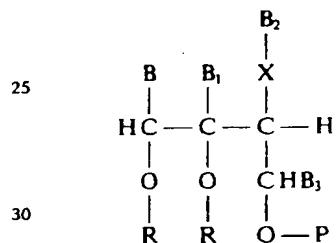
Y: durchschnittliche Markerausbeute. Anzahl der Primärtransfektanten mindestens 1300, mindestens 500 Sekundärtransfektanten gezählt.

Diese Ergebnisse belegen die hohe Ausbeute an biologisch aktivem Material, das gemäß dem erfindungsgemäß Verfahren gewonnen wurde im Vergleich zu herkömmlichen enzymatischen Phosphorylierungsverfahren.

15

Patentansprüche

20 1. Phosphorylierungsreagenz, insbesondere zur Phosphorylierung des 5'-Hydroxyendes von Oligo- und Polynukleotiden, gekennzeichnet durch die allgemeine Formel I



wobei

35 P eine mit einer OH-Gruppe reaktive Phosphat- oder Phosphitgruppe und R eine abspaltbare OH-Schutzgruppe darstellt, X = H, OH, Halogen, Alkyl oder Alkoxy ist oder eine O-, N-, Alkenyl- oder Oxyalkylenoxy-Brücke zu B, B₁ oder B₃ darstellt, einer der Substituenten B bis B₃ eine hydrophobe Verankerungsgruppe oder ein an einen Antikörper bindendes Hapten darstellt, die anderen Substituenten B bis B₃ H oder niedrig Alkyl, B₂ auch eine Einfachbindung, bedeuten.

40 2. Reagenz nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß P einen -P(R₁R₂) Rest darstellt, wobei R₁ und R₂ gleich oder verschieden sind und eine C₁- bis C₄-Alkyl-, Alkenyl-, Aryl- oder substituierte Aryl-, Halogen-, 2-(p-Nitrophenyl)ethyl-, 2-Cyanoethyl-, Diisopropylamidogruppe darstellen.

3. Reagenz nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die abspaltbare OH-Schutzgruppe Ether- oder Estergruppe, insbesondere eine Benzoyl-, Silylether-, Dimethoxytrityl- oder Isopropylidengruppe ist.

45 4. Reagenz nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß B eine Alkylgruppe mit 6 bis 20 C-Atomen, eine Arylgruppe, eine substituierte Arylgruppe oder heterocyclische Arylgruppe oder substituierte Alkylgruppe darstellt.

5. Reagenz nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Alkylgruppen 8 bis 18 C-Atome aufweisen.

50 6. Reagenz nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß X mit B, B₁ oder B₃ über eine Acetalbrücke verbunden ist.

7. Reagenz nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß X zusammen mit B einen Zucker ausbildet.

55 8. Reagenz nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß ein Reagenz verwendet wird, bei dem B eine Naphthylgruppe, eine Mono-, Di- oder Trinitrobenzyl-, eine Dinitrobenzyloxyethylgruppe darstellt.

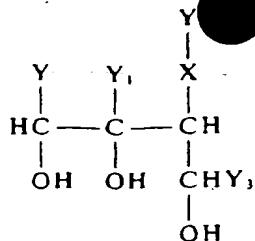
9. Reagenz nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß B ein N³-(3,5-Dinitrobenzyloxyethyl)-2',3'-o-dibenzoyluracilrest ist.

60 10. Reagenz nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß B ein N³-Octyl-2',3'-o-dibenzoyluracilrest ist.

11. Reagenz nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß es N³-Octyl-2',3'-o-dibenzoyluridin-5'-o-(2-cyanoethyldiisopropylamido-phosphit)- oder N³-(3,5-Dinitrobenzyloxyethyl)-2',3'-o-dibenzoyluridin-5'-o-(2-cyanoethyl)-diisopropylamidophosphit ist.

65 12. Reagenz nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß es das benachbarte Diol in Cis-Stellung enthält.

13. Verfahren zur Herstellung eines Phosphorylierungsreagenz nach einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß man einen Diol der allgemeinen Formel II



5

10

in der Y bis Y₃ gleich B bis B₃ sind oder eine mit B bis B₃ verknüpfbare Gruppe darstellen und X und B bis B₃ die in Anspruch 1 definierte Bedeutung aufweisen, zuerst mit einem die benachbarten Diolhydroxyle schützenden Reagenz und dann die endständige Hydroxygruppe mit einer Phosphorverbindung der allgemeinen Formel (R₁R₂R₃)P (R₁R₂R₃)PO oder P(R₁—R₅)₅ umsetzt, wobei die Reste R₁—R₅ gleich oder verschieden sind und gut hydrolysierbare Austrittsgruppen darstellen.

15

14. Verfahren nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß R₁—R₅ ein p-Nitrophenylethanol, Dimethylamin, Oxazin, Tetrazolrest oder ein Halogenatom ist.

20

15. Verfahren nach Anspruch 13 oder 14, dadurch gekennzeichnet, daß eine dreiwertige Phosphorverbindung verwendet wird.

25

16. Verfahren zur Herstellung von an ihrem 5'-Ende phosphorylierten Oligo- und Polynukleotidsequenzen durch Synthese der Nukleotidkette in an sich bekannter Weise, insbesondere durch automatisierte Synthese an einer festen Phase, mit anschließender chemischer Phosphorylierung der endständigen 5'-OH-Gruppe und Abtrennen der nicht phosphorylierten Nukleotidkette an einer Matrix, dadurch gekennzeichnet, daß nach Fertigstellung der gewünschten Nukleotidsequenz das 5'-OH-Ende der Kette mit einem Phosphorylierungsreagenz nach einem der Ansprüche 1 bis 12 umgesetzt, anschließend die phosphorylierte Nukleotidkette von nicht umgesetzten Reagenzien gereinigt wird, die zum Phosphorester γ - und δ -ständigen Diolhydroxyle zum Aldehyd oxidiert werden und die Nukleotidkette mit einer Proton abstrahierenden Base behandelt wird.

30

17. Verfahren nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß die Reinigung der phosphorylierten Nukleotidkette an einer Reversed-phase-Matrix erfolgt.

35

18. Verfahren nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, daß eine Reversed-phase-Matrix mit C₈ bis C₁₈ substituiertem Material verwendet wird.

40

19. Verfahren nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß die Reinigung der phosphorylierten Nukleotidkette durch Affinitätschromatographie erfolgt.

20. Verfahren nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß man die Oxidation der Diole mit Perjodat oder Bleitetraacetat durchführt.

45

21. Verfahren nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß man ein Reagenz mit Benzoyl, geschützten Diolen und mit Cyanoethylphosphitestern verwendet.

22. Verfahren nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, daß man die Schutzgruppen nach der Reinigung in einem Verfahrensschritt gleichzeitig abspaltet.

23. Verfahren nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, daß für die Affinitätschromatographie der immobilisierte Antikörper IgG2/20 verwendet wird.

Hierzu 1 Seite(n) Zeichnungen

50

55

60

65

Fig. 1

